



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE PEDIATRIA
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI



Tesis:

“SOBRE-EXPRESIÓN DE BCL2 COMO FACTOR PRONÓSTICO DE SOBREVIDA EN PACIENTES PEDIATRICOS CON ASTROCITOMA”

Que para obtener el diploma en Oncología Pediátrica

Presenta:

Ana Paulina Rioscovián Soto.

Tutor:

Enrique López Aguilar

Médico oncólogo pediatra adscrito a UMAE HP CMNSXXI

Co.Tutor

Dra. Ana Carolina Sepúlveda Vildosola

Maestro en medicina y educación médica, médico pediatra adscrito a la UMAE pediatría CMN SXXI

Colaboradores

Dra. Georgina Siordia Reyes

Medico patólogo adscrito al hospital de pediatría UMAE CMN SXXI

Dr. Jaime Diegoperez Ramírez

Medico neurocirujano adscrito al hospital de pediatría UMAE CMN SXXI



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE PEDIATRIA
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI



Tesis:

““SOBRE-EXPRESIÓN DE BCL2 COMO FACTOR PRONÓSTICO DE SOBREVIDA EN PACIENTES PEDIATRICOS CON ASTROCITOMA”

Que para obtener el diploma en Oncología Pediátrica

Presenta:

Ana Paulina Rioscovián Soto.

Dr. Hugo Federico Rivera Márquez
PRESIDENTE

Dr. Héctor González Cabello
SECRETARIO

Dr. Lourdes Cabrera
SINODAL

Dr. Miguel Ángel Villasis Kever
SINODAL

Dr. Volkmar Wanzke del Ángel
SINODAL

México DF, Agosto 2010

Indice

Resumen.....	1
Antecedentes.....	2
Justificación.....	6
Planteamiento del problema.....	7
Objetivos, Hipótesis.....	8
Material y métodos	10
Resultados.....	16
Discusión.....	27
Bibliografía.....	30
Anexos.....	33

Resumen

“SOBRE-EXPRESIÓN DE BCL2 COMO FACTOR PRONÓSTICO DE SOBREVIDA EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON ASTROCITOMA”

Antecedentes Los tumores cerebrales representan el tipo de tumor sólido más frecuente en la edad pediátrica. La supervivencia de los pacientes con astrocitoma, es actualmente de menos del 50% a 5 años. La identificación de otros factores asociados al pronóstico permitirá adecuar el tratamiento de estos pacientes. Bcl2 es una proteína involucrada en la inhibición de la apoptosis y la sobreexpresión de la misma se ha observado en diferentes tumores, en los del sistema nervioso central, se ha relacionado con histologías desfavorables y con quimio y radio resistencia sin embargo estos estudios se han realizado únicamente en adultos. **Pregunta de investigación** ¿La sobre-expresión de BCL-2 es un factor pronóstico para la supervivencia y respuesta tumoral en pacientes pediátricos con astrocitoma? **Objetivos** Identificar si la sobreexpresión de Bcl2 es un factor pronóstico para la supervivencia y la respuesta tumoral en pacientes pediátricos. **Material y métodos** Cohorte analítica Se revisaron expedientes de 1995 a 2005 de pacientes en quienes se diagnosticó astrocitoma y se realizó inmunohistoquímica para determinación de sobreexpresión de Bcl2. Se realizaron curvas de supervivencia global, con y sin expresión de BCL2 a 1 y 5 años por método de Kaplan y Meier y se determinó mediante Log rank Test si existió significancia estadística. **Resultados** Se estudiaron 38 pacientes, trece de los cuales (34.2%) sobre expresaron Bcl2 y 25 (65.7%) no lo expresaron. La sobreexpresión del oncogén Bcl2, aquellos con Bcl2 positivo tuvieron una supervivencia de 29% mientras que los pacientes que no sobre expresaron la supervivencia fue de 64%, $p= 0.97$. **Discusión** El entendimiento biomolecular de estos tumores, nos dicta la pauta terapéutica; la sobreexpresión de BCL2, aunado a la biopositividad de otros marcadores, nos puede determinar el empleo de un esquema de quimioterapia más intensivo con respecto de los pacientes con tumores que sean negativos a estos marcadores.

ANTECEDENTES

Los tumores cerebrales representan el tipo de tumor sólido más frecuente en la edad pediátrica. A nivel mundial, la incidencia se encuentra entre 10 y 18 casos por millón por año. La frecuencia de presentación de los tumores cerebrales es del 12%¹.

Los más frecuentes son los que se derivan de la glia hasta en un 60% y de estos los astrocitomas^{1,2}.

La expectativa de vida de acuerdo a la SEER (Surveillance, Epidemiology, End Result) a los 5 años es de 50%.³.

Respecto del cuadro clínico no existen signos o síntomas patognomónicos, sino que estos de manera inicial van en relación al incremento de la presión intracraneal y la localización de la tumoración⁴.

El diagnóstico se complementa con imagen de resonancia magnética, que es el estudio de elección para estos pacientes⁵.

El diagnóstico histopatológico se obtiene por estudio de microscopia de luz e inmunohistoquímica del espécimen obtenido por biopsia estereotáxica o por resección total o subtotal⁶.

El tratamiento es multidisciplinario e involucra neurocirugía, radioterapia y quimioterapia neoadyuvante⁷.

El conocimiento de los factores pronósticos, permite adecuar el tratamiento a estos pacientes. A pesar de que se conocen algunos factores pronósticos, continúa habiendo un grupo de pacientes con evolución desfavorable, por lo que es importante determinar los factores que llevan a un peor pronóstico y de esta manera diferenciarlos y tratarlos de una manera más intensiva.

Los factores de mal pronóstico ya conocidos son: edad menor de 3 años, ya que a estos pacientes no se les puede ofrecer radioterapia, así como localización e histología.

Por localización se ha descrito peor pronóstico en pacientes con tumoración en tallo cerebral, debido a que el acceso quirúrgico se limita únicamente a realización de biopsia, la

vascularización de estos tumores es baja, por lo que la penetrancia de la quimioterapia es limitada, y la baja fracción de crecimiento conlleva a una mala respuesta a quimioterapia.

En México se observó que los pacientes con astrocitomas en cerebelo y aquellos con bajo grado de malignidad tienen mejor pronóstico que los pacientes con tumoración en tallo cerebral y/o alto grado de malignidad ⁸

Los indicadores histológicos de anaplasia y por lo tanto de malignidad son: la atipia nuclear, el número de mitosis, la proliferación vascular y la presencia de necrosis⁹. La supervivencia media de los pacientes con astrocitomas, según la clasificación de la OMS, es de 5 a 7 años para los de grado I, de 2.5 a 3 años para el grado II, de 1,5 a 2 años para el grado III, y de 1 año menos para el grado IV¹⁰. Con la introducción de la quimioterapia neoadyuvante, la supervivencia se ha visto incrementada, en particular con el esquema de quimioterapia utilizando tres drogas (ifosfamida, carboplatino y etopósido)¹¹.

Se han identificado también diversos marcadores biomoleculares que influyen en el pronóstico de estos pacientes. Entre ellos los factores de crecimiento celular que son proteínas que en condiciones fisiológicas regulan el crecimiento y la diferenciación celular. La sobreexpresión de estos se asocia por lo general a una mayor agresividad biológica, y su identificación ha permitido el diseño de nuevas estrategias terapéuticas¹². La sobreexpresión del antígeno Ki67, ha sido demostrada como factor de mal pronóstico, ya que reconoce una proteína que es expresada en todas las fases del ciclo celular, excepto en las fases G0 y fases tempranas de G1, haciendo a los tumores que sobre expresan esta proteína de alta proliferación por lo tanto más agresivos ¹³. La expresión de CD133 o (prolamina) ha demostrado ser también un factor pronóstico ya que es un marcador de superficie celular que se expresa en las células troncales que tienen la capacidad de inhibir la apoptosis y favorecer la angiogénesis, por lo que los tumores, que sobre expresan dicha proteína, son más agresivos¹⁴. La determinación de P53 también ha demostrado ser un marcador de mal pronóstico en pacientes con astrocitoma ya que el estar mutada ó sobre expresada, permite a la célula dañada evadir la apoptosis.¹⁵ Actualmente a histopatología

convencional parece quedar limitada y por lo tanto ya no puede ser considerada como suficiente para realizar el diagnóstico y pronóstico de estos pacientes.

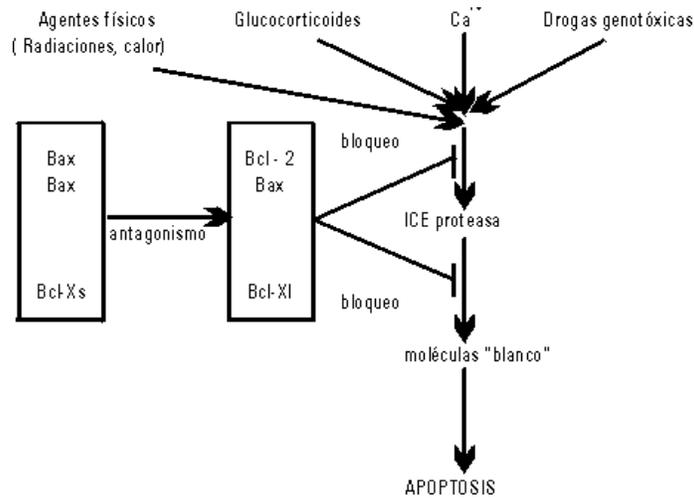
Otro campo de estudio, respecto del pronóstico de pacientes con tumores cerebrales corresponde al estudio de alteraciones en la apoptosis o muerte celular programada. Los mecanismos que regulan la muerte celular, son esenciales para el normal desarrollo y mantenimiento de la homeostasia en los tejidos¹⁶. Las células crecen controladamente, gracias a la expresión de genes, que inducen señales de muerte en estadios definidos de diferenciación y en respuesta a estímulos fisiológicos determinados¹⁷

Debido a que la apoptosis puede considerarse como un proceso de eliminación de células defectuosas, la desregulación de los genes que codifican las proteínas relacionadas con la apoptosis, puede ser la causa del desarrollo de diversos tumores¹⁸.

El bcl-2 (B cell leukemia/lymphoma 2 gen) fue el primer proto oncogén detectado. El oncogén bcl2 está localizado en el cromosoma 18, funciona como un supresor de la apoptosis y puede promover la transformación neoplásica¹⁹.

El gen bcl-2 forma parte de una familia de genes que intervienen en la regulación de la supervivencia de la célula. Los miembros de la familia bcl-2 están integrados por: Bcl-2, Bax, Bad, Bcl-X1, Bcl-Xs, Mcl-1.²⁰ El destino de una célula de morir o sobrevivir está determinado por las diferencias en la expresión de estas proteínas, actuando algunas como promotoras y otras como inhibidoras de las señales de apoptosis²¹.

Regulación de la apoptosis por la familia Bcl-2.



Las alteraciones en este gen pueden provocar, un aumento en la expresión de la proteína citoplasmática Bcl-2, que origina inhibición de la apoptosis y da por resultado la supervivencia de la célula transformada²².

Esta proteína, facilita el aumento de la supervivencia de la célula transformada y de este modo aumenta la posibilidad de futuras aberraciones genéticas, que pueden conducir a la progresión maligna²³.

Está demostrado que la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 en linfomas inducidos experimentalmente, se asocia con la proliferación neoplásica por los efectos inhibitorios de Bcl-2 sobre las vías de apoptosis²⁴.

La expresión de este gen o de su proteína, en algunos tipos de cáncer es un marcador de mal pronóstico.²⁵

Se han realizado diversos estudios para valorar, la relación de la expresión de este gen con el pronóstico en pacientes con astrocitomas.

En 2002, Tyagi, en la India realizo un estudio, en el cual comparó la expresión de Bcl2 en pacientes con tumores primarios del SNC, encontrando mayor expresión de esta proteína comparada con pacientes sanos.²⁶

Streggh en 2008 demostró que la alteración en Bcl2 se correlacionaba con resistencia a quimioterapia y por lo tanto con mal pronóstico, en pacientes adultos con glioblastoma multiforme.²⁷

Liu en 2007, realizó marcadores tumorales con técnica de inmunohistoquímica, entre ellos Ki67, P53 y Bcl2, en pacientes adultos con diagnostico de astrocitoma de alto grado, encontrando que la expresión de estos marcadores es importante para carcinogénesis.²⁸

JUSTIFICACIÓN:

La sobrevida de los pacientes con astrocitoma de alto grado es actualmente de menos del 50% a 5 años en nuestro Hospital. Continúa habiendo un grupo de pacientes con evolución desfavorable, por lo que la identificación de diversos factores pronóstico es importante. Recientemente se han estudiado diversos factores que determinan un pronóstico desfavorable para los pacientes con tumores cerebrales en pediatría, como el Ki67, cuya sobre-expresión se relaciona con tumores de alta proliferación celular; así mismo, el CD133 y el P53 en los cuales la sobreexpresión de los mismos se ha asociado con mal pronóstico, el primero por ser un marcador de superficie celular muy relacionado con la angiogénesis y el segundo por alterar el ciclo celular manteniendo a la célula en fase G1. La identificación de otros factores asociados al pronóstico permitirá adecuar el tratamiento de estos pacientes, siendo más agresivo para aquellos con marcadores sobre-expresados, y más conservador para aquellos pacientes con mejor pronóstico.

Planteamiento del problema

La comportamiento biológico de los pacientes con diagnóstico de astrocitoma ha dado pie a la búsqueda de diferentes factores pronósticos ya que se ha observado que tumores que histológicamente son idénticos se comportan de manera diferente. En nuestra población se han estudiado diferentes marcadores entre los que se encuentran p53, AKT, Ki67 y CD133, los cuales han demostrado ser de mal pronóstico en nuestros pacientes.

Bcl 2 es una proteína involucrada en la inhibición de la apoptosis y la sobreexpresión de la misma se ha observado en diferentes tumores, en los del sistema nervioso central se ha relacionado con histologías desfavorables sin embargo estos estudios se han realizado únicamente en adultos. Ya se ha comprobado que los astrocitomas de adultos y de niños son diferentes, por lo que consideramos importante conocer si la sobreexpresión de esta proteína tiene asociación con el pronóstico en población pediátrica.

¿La sobre-expresión de Bcl2 es un factor pronóstico para la sobrevida en pacientes pediátricos con astrocitomas?

Objetivos Generales

Identificar si la sobreexpresión de Bcl2 es un factor pronóstico para la sobrevida en pacientes pediátricos.

Objetivos secundarios

1. Comparar la sobrevida a 1 y 5 años del diagnóstico de los pacientes pediátricos con astrocitoma que sobre expresan y no Bcl2.
2. Determinar si existe asociación entre Bcl2 e histología en pacientes pediátricos con diagnostico de astrocitoma

Hipótesis

- La sobreexpresión de Bcl2, en pacientes pediátricos con diagnóstico de astrocitoma, se asocia con una supervivencia 30% menor comparado con quienes no lo sobreexpresan.
- La sobre-expresión Bcl-2 se asociará con histología desfavorable (G III o IV de la clasificación de la OMS)

MATERIAL Y METODOS

Lugar

Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI

Tipo de estudio

Cohorte analítica retrolectiva

Tamaño de muestra

Por conveniencia. En el hospital de pediatría UMAE CMN SXXI se cuenta con un laboratorio de investigación en tumores del sistema nervioso central, en el cual se encuentran muestras ultra congeladas de aproximadamente 53 pacientes, de estas muestras, 10 son astrocitomas.

Además en el servicio de patología se encuentran los bloques de parafina de 50 pacientes con diagnóstico de astrocitoma.

Criterios de inclusión:

1. Pacientes menores de 16 años con diagnóstico de astrocitoma establecido en el servicio de Patología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI.
2. Pacientes cuyos datos necesarios para la hoja de recolección se encontraron en el expediente.
3. Pacientes en quienes se realizó biopsia-resección y tenían con bloque de parafina en el servicio de patología del HP CMN Siglo XXI, o que contaron con muestra fresca congelada en el laboratorio de tumores cerebrales del HP CMN SXXI
4. Pacientes que completaron tratamiento en el servicio de Oncología del hospital de Pediatría de acuerdo a protocolo.

Criterios de exclusión

1. Pacientes que abandonaron tratamiento

Criterios de eliminación

1. Pacientes en los que el material tumoral obtenido del bloque de parafina no fue suficiente para establecer la presencia ó no de la sobreexpresión de Bcl2.

VARIABLES

Variable	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Unidades de medición
Tiempo de supervivencia global	Numero de meses que viven los pacientes luego del diagnóstico de astrocitoma realizado por el servicio de patología de HPCMNSXXI	Dependiente	Cuantitativa continua	Meses
Respuesta al tratamiento	Porcentaje de reducción tumoral posterior a 2 y 4 cursos de quimioterapia evaluados por medio de resonancia magnética	Dependiente	Cualitativa ordinal	Respuesta completa: 100% desaparición del tumor Respuesta parcial: 50 a 99% reducción tumoral Enfermedad estable: menos de 50% de reducción tumoral Enfermedad progresiva: más de 25% de progresión tumor
Sobreexpresión de Bcl2	Cuando el resultado de la determinación de Bcl2 en la prueba de inmunohistoquímica sea mayor del 10% de todas las células tumorales. La determinación se realizará en el laboratorio de tumores de SNC del HPCMNSXXI.	Independiente	Cualitativa nominal	Presente Ausente
Localización de la tumoración	Sitio anatómico donde se encuentra la tumoración.	Confusión	Cualitativa nominal	Supratentorial Tallo Cerebelo

Porcentaje de resección.	Porcentaje de la tumoración reseada quirúrgicamente descrita en la hoja postquirúrgica.	Confusión	Cualitativa nominal	Biopsia Resección parcial Resección total
Histología	Reportado por el servicio de patología, en relación al porcentaje de anaplasia encontrado en el espécimen de la tumoración por estudio histopatológico, de acuerdo a la clasificación de la OMS ³ .	Confusión	Cualitativa ordinal	I, astrocitoma difuso II, astrocitoma fibrilar III Astocitoma anáplasio IV Glioblastoma multiforme
Edad	Edad del paciente que se encuentra registrada en el expediente al momento del diagnóstico.	Universal	Cuantitativa continua	Meses
Sexo	Genero que se encuentra registrado en el expediente.	Universal	Cualitativa nominal	Masculino Femenino

Descripción general del estudio

Se revisaron todos los expedientes de 1995 a 2008 del Hospital de Pediatría, de los pacientes en quien en este hospital se realizó diagnóstico de astrocitoma. Se registraron los datos en la hoja de recolección. Además se recabaron los bloques de parafina o muestra congelada en fresco, a los cuales se realizó técnica de inmunohistoquímica para determinación de sobreexpresión de la proteína Bcl2. Ver anexo

Análisis estadístico:

Para las variables cuantitativas continuas se utilizó mediana como medida de tendencia central y valor mínimo y máximo como medidas de dispersión.

Para las variables cuantitativas discretas se utilizó mediana como la medida de tendencia central y valor mínimo y máximo como medidas de dispersión.

Para las variables cualitativas se utilizaran moda y frecuencias simples.

Inferencial

Se realizaron curvas de supervivencia global a 1 y 5 años de acuerdo al método de Kaplan y Meier para determinar porcentaje de supervivencia en cada grupo (astrocitomas que sobreexpresan y no Bcl2) y posteriormente se determinó mediante Log rank Test si existió significancia estadística.

FACTIBILIDAD.

Recursos humanos:

Tesista médico residente oncología pediátrica.

Tutor médico adscrito.

Co Tutor maestro en ciencias médicas

Médico patólogo e histotecnólogo

Recursos materiales

Hojas blancas, lápices, computadora, paquete estadístico, SPSS versión 15. Impresora, reactivos para realización de inmunohistoquímica.

Recursos financieros.

No se requiere financiamiento, los gastos que se generados serán cubiertos por el laboratorio de investigación en tumores del sistema nervioso central.

Aspectos éticos

Este estudio de acuerdo a la Ley General de Salud es un estudio sin riesgo por lo que no requirió de hoja de consentimiento informado. Por otra parte cumple con los principios éticos de investigación de justicia, beneficencia y autonomía.

Para los pacientes cuya muestra se encuentra en el laboratorio de investigación en tumores del sistema nervioso central, se cuenta con consentimiento informado de todos los padres o tutores, para la realización de estudios moleculares en el tejido tumoral ultracongelado.

RESULTADOS

Se estudiaron 47 pacientes, de los cuales se excluyeron 7, por no contar con los datos necesarios en el expediente y en 2 en los que la muestra de tejido no fue suficiente para realizar la técnica de inmunohistoquímica, por lo que se reportan los resultados de 38 pacientes.

La mediana de edad en los pacientes estudiados, fue de 5 años, con un rango de 3 a 16 años. La razón hombre mujer fue de 0.9:1 (18 hombres: 20 mujeres)

En cuanto a histología 29 pacientes (76.3%), correspondieron a astrocitomas de bajo grado (12 (31.5%) astrocitoma fibrilar y 17 (44.7%) a astrocitoma difuso) y 9 astrocitomas de alto grado 7(18.4%) fueron astrocitomas anaplásicos y 2 (5%) glioblastomas multiformes. Por localización, 14 (36%) fueron supratentoriales, 15 (39.4%) infratentoriales y 9(23.6%) en tallo cerebral.

De acuerdo al tipo de cirugía realizada, a seis pacientes (15%) se les realizó biopsia, a 22 (57.8%) resección parcial y a 10 (26.31%) se realizó resección total.

Respecto del estado actual, 23 pacientes están vivos (60.5%) y 15 pacientes (39.5%) han fallecido; de acuerdo a la histología, de los 29 pacientes con astrocitoma de bajo grado 20 (68.9%) están vivos y 9 (31.1%) muertos. De los 9 pacientes con astrocitoma de alto grado aquellos con astrocitoma anaplásico 3 (33%) están vivos y 4 (44.4%) muertos; los 2 pacientes restantes con glioblastoma multiforme fallecieron. Por localización de los 14 pacientes con astrocitoma supratentorial 7 han fallecido y 7 están vivos (50%). 11 de 15 pacientes (73.3%) están vivos y 4 (26.7%) han fallecido. Los pacientes con tumor en tallo cerebral 5 están vivos y 4 han fallecido, 55% y 45% respectivamente.

Trece pacientes (34.2%) sobre expresaron Bcl2 y 25 (65.7%) no lo expresaron.

De acuerdo a la histología 9 de los 29 (31%) pacientes con histología de bajo grado sobre expresaron el oncogén Bcl2 mientras que 4 de los 9 pacientes (44.4%) con astrocitoma de alto grado lo expresaron.

Por localización Bcl2 se sobreexpresó en 3 de 12 (25%) pacientes con astrocitoma fibrilar sobre expresaron Bcl2, 6 de 11 (54%) pacientes con astrocitoma difuso, 3 de 4 (75%) con

astrocitoma anaplásico y 1 (50%) paciente con glioblastoma multiforme. Por el tipo de cirugía realizada, los pacientes a los que se realizó biopsia, seis, no sobre expresaron Bcl2, 12 de los 22(54.5%) a los que se realizó resección parcial si lo sobre expresaron y 1 de 9 (11.1%) a los que se realizó resección total también lo sobreexpresó.

Respecto de la edad 4 de 5 (80%) pacientes menores de 3 años sobre expresaron esta proteína y 9 de 20 (45%) pacientes mayores de 3 años la sobre expresaron.

La sobrevida global de acuerdo al método de Kaplan Meier fue de 56% a 5 años (grafica 1)

La sobrevida global a 5 años, de acuerdo a genero, fue de 51% para sexo femenino y 60% para masculino ($p=0.87$). Grafica 2.

Por histología, la sobrevida a 5 años fue de 44% para los pacientes con astrocitoma fibrilar, de 76% para los pacientes con astrocitoma difuso, 42% en astrocitoma anaplásico y 0% para glioblastoma multiforme ($p= 0.511$). Por bajo y alto grado la sobrevida a 5 años fue de 60% y 33.3% respectivamente $p=0.483$. Grafica 3 y 4.

Respecto de la localización la sobrevida global a 5 años fue de 46% para los supratentoriales, 73% para infratentoriales y 35% tallo cerebral $p=0.546\%$. Grafica 5.

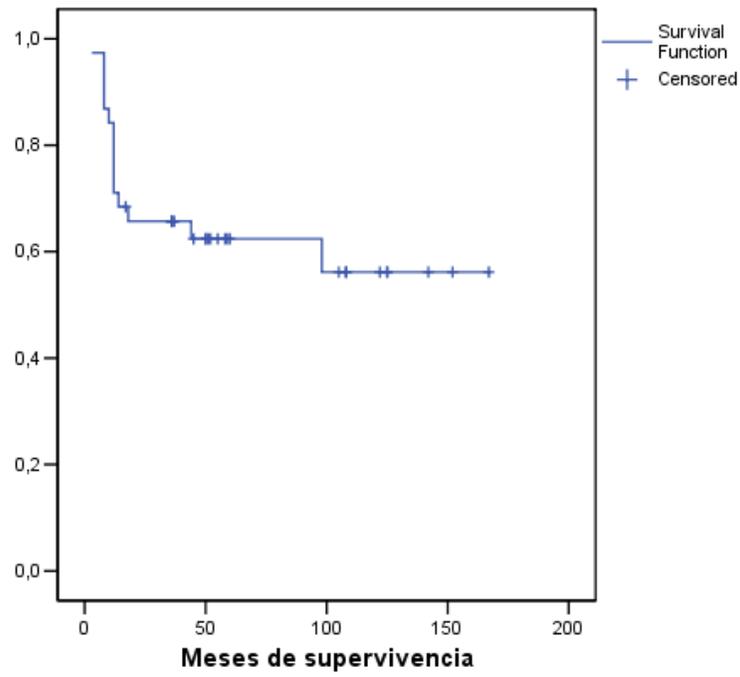
De acuerdo al tipo de cirugía, la sobrevida a 5 años, fue de 16% a los pacientes a quienes se realizó biopsia, 72% a los que se realizó resección parcial y 60% para los que se realizó resección total $p=0.0036$, Grafica 6.

La sobreexpresión del oncogén Bcl2, aquellos con Bcl2 positivo tuvieron una sobrevida de 29% mientras que los pacientes que no lo sobre expresaron la sobrevida fue de 64%, $p= 0.97$ Grafica 7.

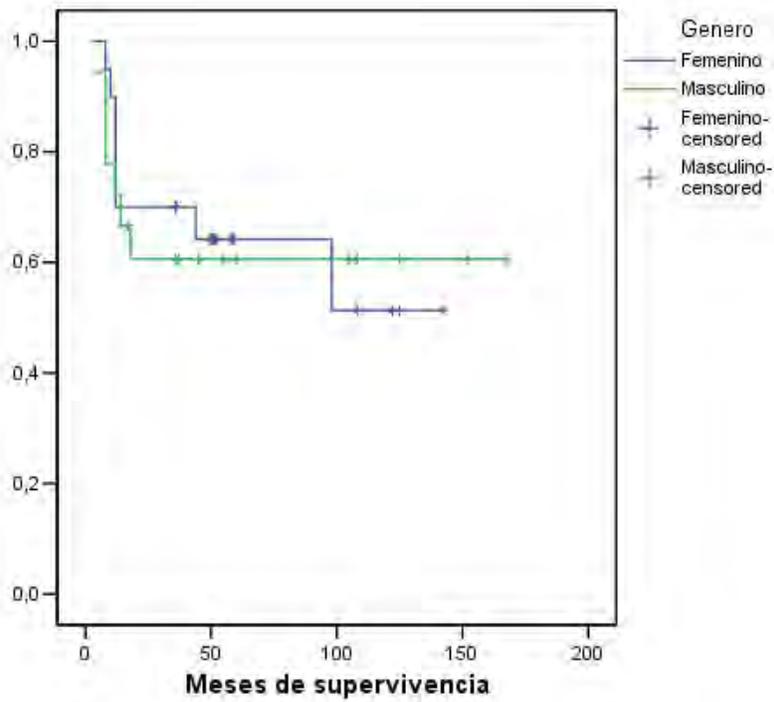
Tabla 1. Características de los pacientes con diagnóstico de astrocitoma

		N	(%)
Edad	Mediana	6	
	Rango	1-16	
Sexo	Femenino	20	
	Masculino	18	
Localización	Supratentoriales	14	(36.5%)
	Infratentoriales	15	(39.4%)
	Tallo cerebral	9	(23.6%)
Tipo de cirugía	Biopsia	6	(15%)
	Resección parcial	22	(57.8%)
	Resección total	10	(26.31%)
Histología	Bajo grado	29	(76.3%)
	- AF	12	(41.3%)
	- AD	17	(58.7%)
	Alto grado	9	(23.6%)
	- AA	7	(77.7%)
	- GM	2	(22.2%)
Sobreexpresión Bcl2	Positiva	13	(34.2%)
	Negativa	25	(65.7)

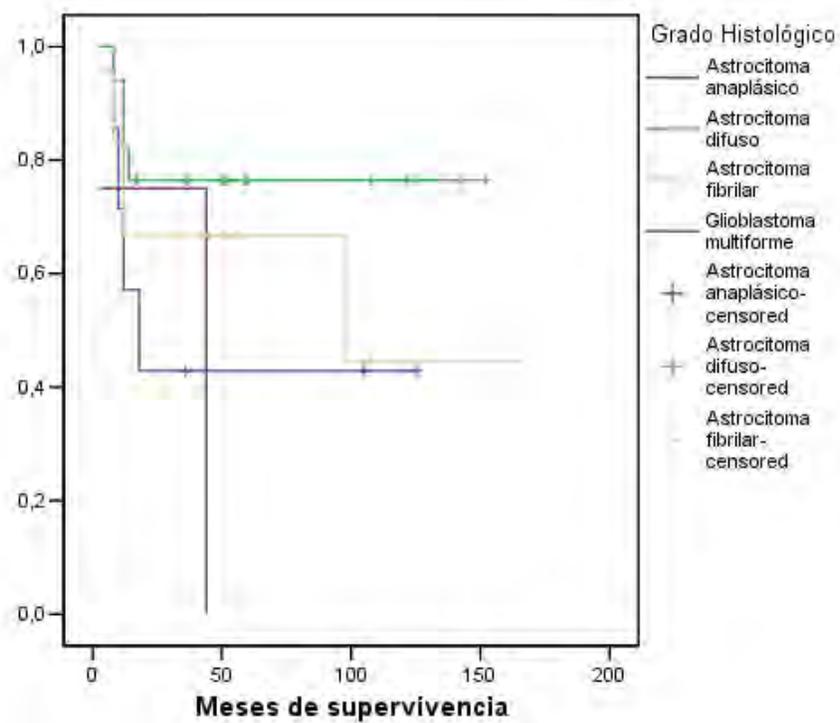
AF astrocitoma fibrilar AD astrocitoma difuso AA astrocitoma anaplásico GM glioblastoma multiforme



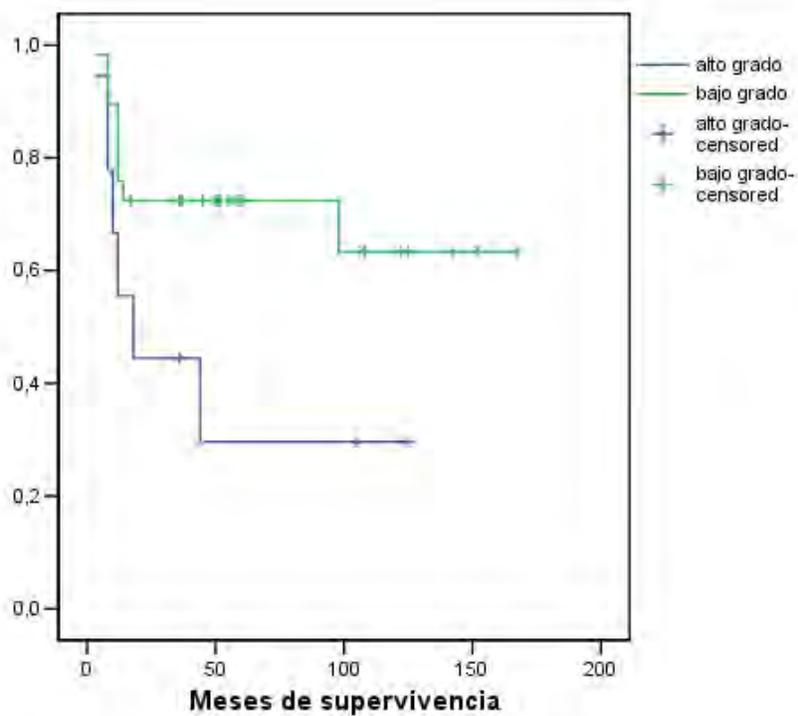
Gráfica 1. Curva de sobrevida global



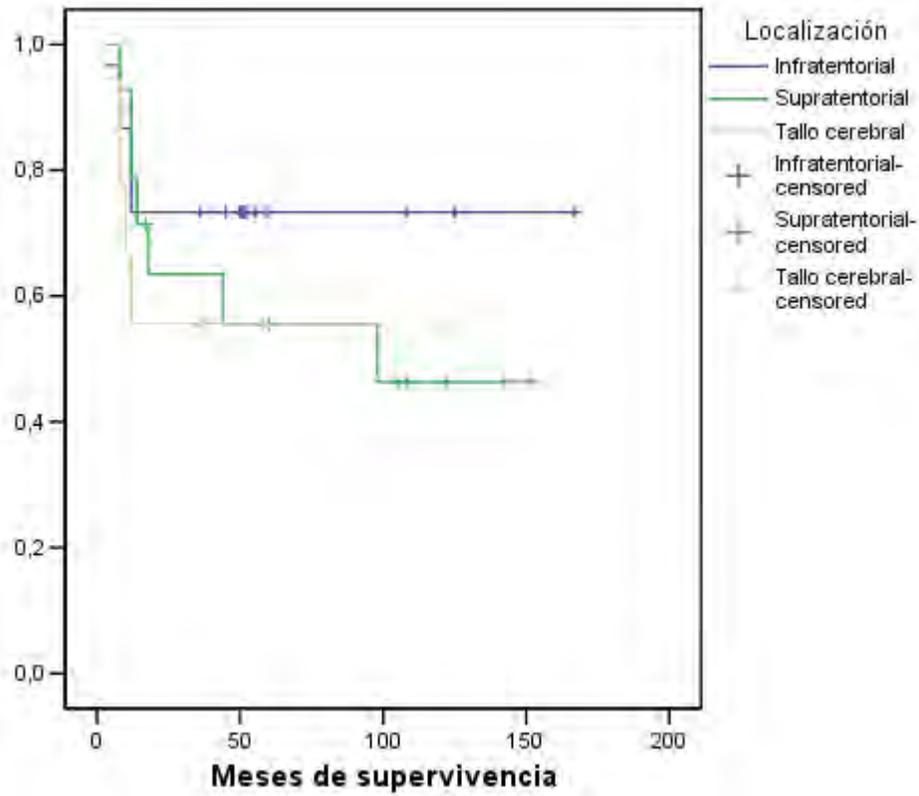
Gráfica 2. Curva de sobrevida de acuerdo a sexo.



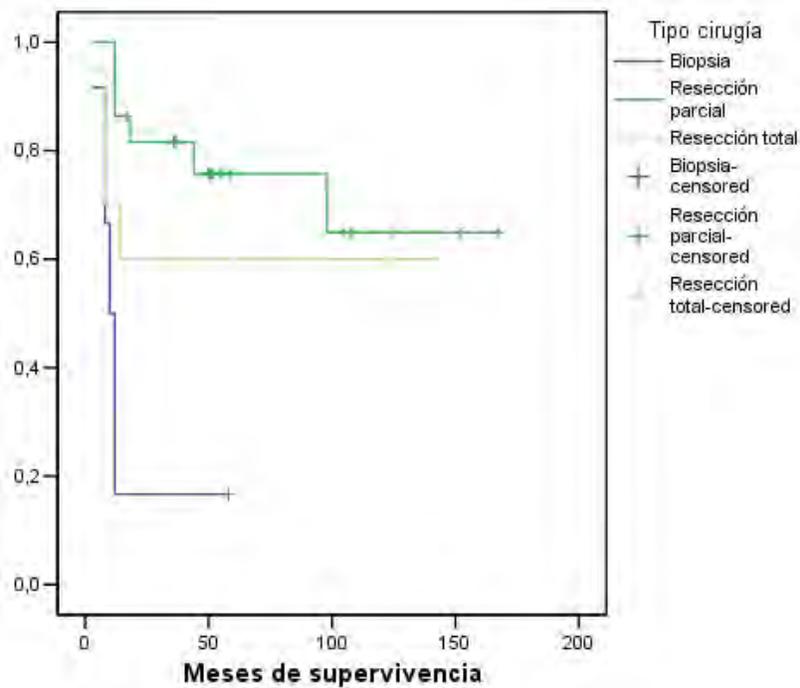
Gráfica 3. Curva de sobrevivência de acordo a histologia OMS



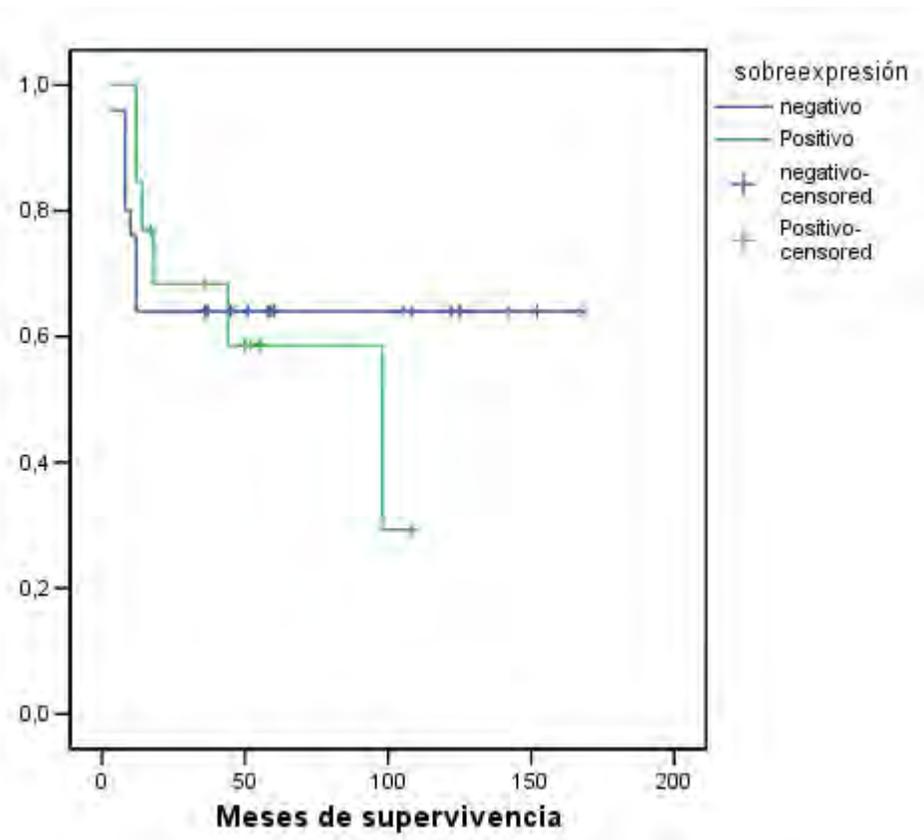
Gráfica 4. Curva de sobrevivência de acordo al grado histológico



Gráfica 5. Curva de sobrevida de acuerdo a localización



Gráfica 6. Curva de sobrevida de acuerdo al tipo de cirugía



Grafica 7. Curva de sobrevida de acuerdo a la expresión de Bcl2

Tabla 2. Sobrevida de los pacientes con diagnóstico de astrocitoma

		Supervivencia	
		a 5 años	P
Sexo	Femenino	51%	0.087
	Masculino	60%	
Localización	Supratentoriales	46%	0.51
	Infratentoriales	73%	
	Tallo cerebral	35%	
Tipo de cirugía	Biopsia	16%	0.03
	Resección parcial	72%	
	Resección total	60%	
Histología	Bajo grado		0.04
	- AF	44%	
	- AD	76%	
	Alto grado		
	- AA	42%	
- GM	0%		
Sobreexpresión Bcl2	Positiva	29%	0.87
	Negativa	64%	

AF astrocitoma fibrilar AD astrocitoma difuso AA astrocitoma anaplásico GM glioblastoma multiforme

Discusión

La sobrevida de los pacientes con diagnóstico de tumores cerebrales, específicamente con astrocitoma, es reportada en la mayoría de los estudios internacionales del 50 al 60% a 5 años. Esta ha mejorado en los últimos 15 años, debido al empleo de esquemas de quimioterapia mas intensivos, que incluyen fármacos que han probado su efectividad in vitro e in vivo, tal es el caso del carboplatino, que aunado a la sinergia existente entre la combinación de ifosfamida y VP16 ha probado su efectividad en gran número de estudios. La tendencia actual para estos pacientes es el tratamiento individualizado de acuerdo al riesgo que tengan, tanto de morir como de respuesta a tratamientos, para lo cual es muy importante conocer el comportamiento bio-molecular de estos tumores para poder dirigir de manera más acertada un tratamiento. Resultado de este conocimiento, han surgido nuevos fármacos, como los antiangiogénicos o aquellos dirigidos contra factores de crecimiento epitelial o del endotelio vascular que se encuentran sobre expresados en estas neoplasias^{29, 30}.

Un campo de estudio, en constante crecimiento, para la explicación de biología molecular en pacientes con tumores cerebrales, es el estudio de la apoptosis o muerte celular programada. En condiciones normales el desarrollo de un tejido guarda un estrecho equilibrio entre las células proliferantes y las que se van muriendo (vía apoptosis) ó bien que se diferencian, al presentar una alteración, ya sea aumento de la proliferación ó inhibición de la apoptosis, estas células, rompen esta homeostasis y tienden a inmortalizarse, y si este programa de perdida celular se altera, las células continúan en proliferación de manera indefinida³¹.

Bcl2 es una familia, compuesta de 19 genes, que pueden promover o inhibir la apoptosis, dentro de los miembros de esta familia se encuentran BAX que favorece la apoptosis y Bcl2 que la inhibe. Se encuentra localizado en el cromosoma 18. Las proteínas de este gen, ejercen un efecto inhibitor sobre la permeabilización de la membrana mitocondrial, que libera el citocromo c hacia el citoplasma de la célula, el cual a su vez inicia la vía intrínseca de la apoptosis a través de la activación de las caspasas 7.

Bcl2 es un proto-oncogén que prolonga la sobrevida de las células, al bloquear la apoptosis, y esta inhibición puede promover la transformación neoplásica.

Trabajos recientes realizados por Stegth se ha demostrado que aquellos pacientes que sobreexpresan el bcl2 previenen la muerte celular inducida por radioterapia³².

Esta molécula a pesar de no ser nueva, dado que desde el 1988 se había visto sobreexpresada en pacientes con LNH y fue hasta fines de los 90s que se atribuyó un rol en la oncogénesis.

En el presente trabajo la expresión de este oncogén, se manifestó de manera más frecuente en aquellos pacientes portadores de astrocitoma de alto grado (49%), con respecto de aquellos pacientes portadores de un astrocitoma de bajo en el cual estuvo presente en el 30%. A pesar de no existir significancia estadística, si la hay clínica.

Lo anteriormente expuesto se corrobora al hacer una correlación, entre la sobreexpresión de oncogén Bcl2 y la sobrevida, en la cual encontramos una sobrevida de 64%, a 5 años para pacientes que no expresaban esta oncogén vs 29% que presentaban (P=0.76). Consideramos que existe significancia clínica con un OR para fallecer de 1.5 para los pacientes que sobre expresan Bcl2, es importante considerar también, que el porcentaje de la sobreexpresión dado que aquellos que presentaron más de 25 % de sobreexpresión presentaron SV de 31% a 10 años vs 66% para aquellos que no lo expresaron.

En este trabajo resulta importante mencionar que se corrobora, lo que en múltiples estudios se ha expuesto, el tipo de cirugía realizada en estos pacientes, lo cual se reflejó en la sobrevida, al presentar 64% de supervivencia a 5 años para los pacientes sometidos a resección parcial o total vs 16% de aquellos en quienes se realizó biopsia (p=0.003).

Por histología, se corroboró un peor pronóstico, para el grupo de pacientes con glioblastoma multiforme, la cual fue de 0% a 5 años vs 76% y 58% para bajo grado (difuso y fibrilar).

Consideramos que el presente trabajo es de utilidad, no obstante debemos ser juiciosos al tratar de incorporar los nuevos biomarcadores moleculares como factores pronóstico, en este tipo de pacientes.

Debe conocerse a profundidad el comportamiento biológico de estos tumores para poder dirigir una terapia adecuada al riesgo, sin embargo, continúan existiendo factores pronósticos clínicos y quirúrgicos ya establecidos que siguen vigentes.

El continuar con este trabajo e incrementar la muestra de pacientes, será importante para tratar de disminuir el error estadístico, por tamaño de muestra y contribuirá al mejor entendimiento del comportamiento de este tipo de pacientes.

A pesar de que algunos autores como Tyagi mencionan a Bcl2 como factor pronóstico importante, encontrando en su estudio una diferencia estadística, en cuanto a la expresión de este oncogén en el tejido tumoral resecado al compararlo con el parénquima cerebral adyacente³³.

Y aunque tampoco se encontró una correlación con el grado histopatológico, si se considera a la sobreexpresión de este oncogén, como un evento molecular importante que hace a estos tumores quimio y radio resistentes. Lo anterior corrobora y nos ayuda a concluir la importancia de este trabajo, en el cual el entendimiento biomolecular, nos dicta la pauta terapéutica, esto es la sobreexpresión de BCL2, que aunado a la biopositividad de otros marcadores, nos pueden determinar el empleo de un esquema de quimioterapia mas intensivo con respecto de lo pacientes con tumores que sean negativos a estos marcadores.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Fisher J, Schwartzbaum J, Wrensch M, Wiemels. Epidemiology of Brain Tumors *Neurol Clin* 25 ;2007: 867–890
- ² Cuevas-Ureostegui ML, Villasis-Keever MA, Fajardo-Gutierrez A. Epidemiología del cáncer en adolescentes *Salud Publica Mex.* 2003;45:115-123
- ³ Compendio del Registro Histopatológico de Neoplasias en México. Morbilidad, regionalización 1993-1996 y mortalidad. Tendencias 1985-1995, México. Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología., 1998
- ⁴ Omuro A, Leite C, Mokhtari K, Delattre J. Pitfalls in the diagnosis of brain tumours. *Lancet.* 2006;5:937-948.
- ⁵ Rutkowski S, Bode U, Deinlein F, et al. Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy alone. *NEJM* 2005;352:978-986
- ⁶ Vezina L-G. Imaging of central nervous system tumors in children. *J Child Neurol.* 2008; 23:1128-1135.
- ⁷ Nejat F, El Khashab M, Rutka JT. Initial management of childhood brain tumors: neurosurgical considerations. *J Child Neurol.* 2008;23:1136-1148.
- ⁸ Lopez-Aguilar E, Cerecedo-Diaz F, Sepulveda-Vidosola A, Rivera-Marquez H, Castellanos-Toledo A, Arias-Gomez J et al. Astrocitomas en pediatría. Factores pronósticos. *Gac Med Mex:*1994;133:231-235
- ⁹ Bailey P, Cushing H. A classification of the tumors of the gliomas group on a histiogenetic basis with correlated study of prognosis. Philadelphia: JP Lippincott, 1996
- ¹⁰ Rorke LB, Gilles FH, Davis RL. Revision of the World Health Organization classification of brain tumors for childhood. *Cancer* 2000;56:1869-1886
- ¹¹ Lopez-Aguilar E, Cerecedo-Diaz F, Sepulveda-Vidosola A, Rivera-Marquez H, Castellanos-Toledo A, Arias-Gomez J et al. Preirradiation with carboplatine, ifosfamide y etoposide in high grade astrocitomas. *Arch Med Res.* 2003; 98:145-51.
- ¹² Cohen BH, Zeltzer PM, Boyett JM, et al. Prognostic factors and treatment results for supratentorial primitive neuroectodermal tumors in children using radiation and chemotherapy: A children Cancer Group randomized trial. *J Clin Oncol* 1995;13:1687-1696

-
- ¹³ López-Aguilar E, Sepúlveda-Vildósola AC,.Sobrevida de los pacientes con astrocitomas de alto grado que sobreexpresan Ki67 en pacientes con astrocitoma de alto grado en la UMAE pediatría CMNSXXI. Gac Med. 2010;
- ¹⁴ Nishide K, Nakatani Y, Kiyonari H, Kondo T Glioblastoma formation from cell population depleted of Prominin1-expressing cells. PLoS One. 2009 Aug 31;4(8):e6869.
- ¹⁵ Yin B, Kogan SC, Dickins RA, Lowe SW, Largaespada DA. Trp53 loss during in vitro selection contributes to acquired Ara-C resistance in acute myeloid leukemia. Exp Hematol 2006; 34: 631-41.
- ¹⁶ Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. Annu Rev Cell Biol 1991;7:663.
- ¹⁷ Martín SJ. Apoptosis: suicide, execution or murder?. Trens in cell biology 1993;3:141-44.
- ¹⁸ Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE et al : Bcl2 and Bcl2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. Cell 1993; 74: 597-603
- ¹⁹ Minn AJ, Velez P, Schendel SL et al : BCL2L1 forms an ion channel in synthetic lipid membrane. Nature 1997; 385: 353-357
- ²⁰ Yang E, Zha J, Jockel J. Bad a heterodimeric partner for Bcl-2 and Bcl-XL, displaces Bax and promotes cell death. Cell 1995;80:285-91.
- ²¹ Kaul D, Kaur M : Receptor-CK controls the expression of Bcl2 and cyclin 'D' genes. Leukemia Res 1998; 22: 671-675
- ²² Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: Regulator of cell death. Blood 1992;80:879
- ²³ Negrini M, Silini E, Kozak C : Molecular analysis of mbcl-2; structure and expression of the murine gene homologous to the human gene involved in follicular lymphoma. Cell 1987; 49: 455-463.

-
- ²⁴ Núñez G, Merino R, Grillot D, Gonzales-García M. Bcl-2 y Bcl-x regulatory switches for lymphoid death and survival. *Immunol. Today* 1994;15(12):582-88.
- ²⁵ Binder C, Marx D, Overhoff R, Binder L, Schauer A, Hiddemann W. Bcl-2 protein expression in breast cancer in relation to established prognostic factors and other clinicopathological variables. *Annals of Oncology* 1995;6:1005-10.
- ²⁶ Tyagi D, Sharma BS, Gupta SK, Expression of Bcl2 proto-oncogene in primary tumors of the central nervous system *Neurol India*. 2002 Sep;50(3):290-4.
- ²⁷ Stegh AH, Chin L, Louis DN, DePinho RA. What drives intense apoptosis resistance and propensity for necrosis in glioblastoma? A role for Bcl2L12 as a multifunctional cell death regulator. *Cell Cycle*. 2008 Sep 15;7(18):2833-9
- ²⁸ Liu X, Chen N, Wang X, Apoptosis and proliferation markers in diffusely infiltrating astrocytomas: profiling of 17 molecules. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006 Sep;65(9):905-13.
- ²⁹ Norden Y, Muzikansky K, Ciampa D. Bevacizumab for recurrent malignant gliomas: Efficacy, toxicity, and patterns of recurrence. *Neurology* 2008; 70(10): 779-787.
- ³⁰ Bode S, Buchen G, Janssen T, Reinhard. Results of a phase II trial of h-R3 monoclonal antibody (nimotuzumab) in the treatment of resistant or relapsed high-grade gliomas in children and adolescents. *J Clin Oncol*, 2006;24:1522
- ³¹ Kobayashi T, Masumoto J, Tada T, Nomiya T, Hongo K, Nakayama J. Prognostic significance of the immunohistochemical staining of cleaved caspase-3, an activated form of caspase-3, in gliomas. *Clin Cancer Res*. 2007 Jul 1;13(13):3868-74.
- ³² Stegh AH, Kesary S, Mahoney JE. Bcl2 L12-mediated inhibition of effector caspase-3 and caspase-7 via distinct mechanisms in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci*. 2008.5: 10703-8
- ³³ Tyagi D, Sharma BS, Gupta SK. Expression of Bcl2 proto-oncogene in primary tumors of the central nervous system. *Neurol India*. 2002 Sep;50(3):290-4.

Anexo 1

TECNICA DE INMUNOHISTOQUIMICA PARA DETERMINACION DE BCL2

Se realizaran cortes de 4 micras de los bloques de parafina, los que se colocaran sobre laminillas cargadas con testigo positivo para BCL2

Previo a la inmunotinción, las muestras de tejido se desparafinan en estufa a 60^a por 2 horas y se incluyen en xilol para posteriormente hidratarlas en alcoholes graduales (90°, 80° y 70°).

Se realizara recuperación de sitios antigénicos utilizando una solución de citrato buffer previamente diluido al 1:10 con pH de 6 en autoclave, durante 5 minutos y se colocaran en estufa a 125° C por 5 min y se realizara inmunohistoquímica

El proceso de inmunotinción se inicia con la aplicación de 200 microlitros de reactivo bloqueante de peroxidasa endógena metanol-H₂O₂ al 3% previamente preparado y se incuban las muestras durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se bloqueó la colágena con 200 microlitros de una solución de suero de caballo al 20% durante 15 minutos.

Se utilizara reactivo de oncoproteína Bcl2 a dilución 1:50, utilizando como control positivo tejido de amígdala.

Se revelara la reacción introduciendo las muestras en una solución de sustrato cromógeno DAB preparada unos minutos antes de usar e inmediatamente se llevara la muestra a estufa de 37°C, durante 3 minutos. Las laminillas se tiñiran con hematoxilina de Harris durante 12-15 segundos para contrastar.

Anexo 2

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

Folio _____

Nombre _____

Filiacion _____

Edad : Años _____ Meses _____

Sexo Masculino () Femenino ()

Diagnostico _____

PQ _____

Localización _____

Fecha de diagnostico _____

Fecha de ultima cita _____

Fecha de recaida _____

Fecha de defunción _____

Causa de defunción: _____

Expresion Bcl2: presente () Ausente ()

QT recibida _____

Numero de ciclos _____

Radioterapia si () No ()

Numero de sesiones _____ Gy _____

Cirugía: Total _____ subtotal _____ biopsia _____

Respuesta a quimioterapia: Completa () Parcial() EE() EP()

RC: 100% desaparición del tumor

RP: 50 a 99% reducción tumoral

EE: menos de 50% de reducción tumoral

EP: mas de 25% de progresión tumoral